



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C07K 14/705, 16/28</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/31138</b> (43) Date de publication internationale: 2 juin 2000 (02.06.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE99/00149</p> <p>(22) Date de dépôt international: 19 novembre 1999 (19.11.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 9800835 19 novembre 1998 (19.11.98) BE</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES [BE/BE]; 50, avenue F.D. Roosevelt, B-1050 Bruxelles (BE).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): HUEZ, Georges [BE/BE]; 19, avenue de l'Armistice, B-1420 Braine-L'Alleud (BE). MAJJAJ, Samira [MA/BE]; 111, rue de l'Instruction, B-1070 Bruxelles (BE). KRUYSS, Véronique [BE/BE]; 3, avenue Armand Forton, B-1950 Kraainem (BE). DROOGMANS, Louis [BE/BE]; 452, avenue de l'Exposition, B-1090 Bruxelles (BE). DEBLANDRE, Gisèle [BE/US]; 7204 Eads Avenue, La Jolla, CA 92037 (US).</p> <p>(74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, 6/1, place Reine Fabiola, B-1083 Bruxelles (BE).</p>	<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: MEMBRANE ANTIGENIC STRUCTURE INDUCING STOPPAGE OF PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF ACTIVATED T-LYMPHOCYTES</p> <p>(54) Titre: STRUCTURE ANTIGENIQUE MEMBRANAIRE INDUISANT L'ARRET DE LA PROLIFERATION ET L'APOPTOSE DE LYMPHOCYTES T ACTIVES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a membrane antigenic structure characterised in that it is of the glycoprotein type and has a molecular weight of 75 KD and it is expressed: in APC cells (Antigen Presenting Cells), in particular in Daudi and Namalwa lymphoblastoid lines and certain promyelocytic lines, in particular the HL60 and K562 cells; in the CD14+ monocytes of peripheral blood in response to an inflammatory type treatment; in (CD3+) T-lymphocytes, in response to treatments by PHA and PMA agents, alone or combined with calcium ionophore; in cell subpopulations expressing the B-lymphocyte specific CD20 marker; and in dendritic cells; and its activation induces stoppage of proliferation and apoptosis of activated T-lymphocytes.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention est relative à une structure antigénique membranaire caractérisée en ce qu'elle est de nature glycoprotéique et présente un poids moléculaire de 75 KD, en ce qu'elle est exprimée: dans des cellules APC (Antigen Presenting Cells), en particulier dans les lignées lymphoblastoïdes Daudi et Namalwa et dans certaines lignées promyélocytaires, en particulier les cellules HL60 et K562, dans les monocytes CD14+ de sang périphérique en réponse à un traitement de type inflammatoire, dans des lymphocytes T (CD3+), en réponse à des traitements par les agents PHA et PMA, seul ou en association avec un ionophore de calcium, dans des sous-populations cellulaires exprimant le marqueur CD20 spécifique des lymphocytes B, et dans les cellules dendritiques, et en ce que son activation induit l'arrêt de la prolifération et l'apoptose de lymphocytes T activés.</p>		

### *UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

5

STRUCTURE ANTIGENIQUE MEMBRANAIRE INDUISANT L'ARRET DE LA  
PROLIFERATION ET L'APOPTOSE DE LYMPHOCYTES T ACTIVES

10

Objet de l'invention

La présente invention est relative à une nouvelle structure antigénique membranaire induisant l'arrêt de la prolifération et l'apoptose de lymphocytes T  
15 activés.

La présente invention est relative également à tout agoniste ou antagoniste de cette structure antigénique membranaire induisant ou inhibant l'arrêt de la prolifération des cellules sanguines, en particulier des  
20 lymphocytes T activés.

La présente invention est également relative à une composition pharmaceutique comprenant ladite structure antigénique, ledit agoniste ou antagoniste et un véhicule pharmaceutique adéquat pour la prévention et/ou le  
25 traitement de pathologies liées à une prolifération anormale de lymphocytes T activés, ainsi qu'à une méthode d'identification (screening) de molécules connues ou non connues, agonistes ou antagonistes, de ladite structure antigénique membranaire de l'invention.

30

Arrière-plan technologique à la base de l'invention

L'homéostasie d'un organisme multicellulaire est assurée non seulement par la prolifération et la différenciation cellulaires mais également par la mort  
35 cellulaire programmée encore appelée apoptose. L'apoptose

est une forme de mort cellulaire qui se distingue de la  
nécrose par une condensation du cytoplasme, la formation de  
protubérances au niveau de la membrane plasmique, une  
condensation de la chromatine nucléaire en périphérie du  
5 noyau et une fragmentation internucléosomique de l'ADN.

La mort cellulaire par apoptose joue un rôle  
majeur au cours de la maturation et du contrôle de la  
prolifération des lymphocytes T. Les précurseurs des  
lymphocytes T CD4+CD8+ originaires de la moelle, migrent  
10 dans le thymus où ils subissent une maturation en  
lymphocytes CD4+ ou en lymphocytes CD8+. Enfin, l'apoptose  
joue un rôle déterminant dans la diminution du nombre de  
lymphocytes T spécifiques d'un antigène après une réponse  
immune. Ce mécanisme assure le contrôle de la réponse  
15 immune et empêche la persistance dans l'organisme d'un trop  
grand nombre de lymphocytes T activés (Cohen et al., 1992,  
Janeway, 1994).

Il a été montré que l'élimination des  
lymphocytes T périphériques activés est en grande partie  
20 dépendante du système des couples de ligand/récepteur  
membranaire dont les prototypes sont Fas ligand/Fas et  
TNF- $\alpha$ /récepteur de type I du TNF- $\alpha$  (TNFRI) (Sytwu et al.,  
1996). Fas et le récepteur de type I du TNF- $\alpha$  font partie  
d'une superfamille de récepteurs qui se caractérisent par  
25 la présence de motifs riches en cystéine dans leur domaine  
extracellulaire. Au sein de cette famille, certains  
récepteurs contiennent dans leur partie intracellulaire un  
domaine de mort cellulaire (death domain) qui transmet le  
signal d'apoptose. C'est le cas des récepteurs CAR1, TRID,  
30 DR3, DR4, DR5, NGFR, Fas, et TNFRI. D'autres membres de  
cette superfamille peuvent induire l'apoptose sans posséder  
un tel domaine de mort cellulaire. L'expression pléiotrope  
de TNFRI et de Fas ne permet pas d'envisager l'utilisation  
de ces molécules comme cibles d'agents pouvant induire  
35 sélectivement l'apoptose d'une classe particulière de

cellules du système immunitaire. Cependant, une telle possibilité serait extrêmement intéressante puisqu'elle offrirait le moyen de traiter des pathologies liées à la prolifération anormale d'un type particulier de cellules.

5

#### Buts de l'invention

La présente invention vise à fournir un nouveau type de structure antigénique membranaire comparable aux récepteurs susmentionnés et dont l'induction  
10 ou l'inhibition provoque l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des lymphocytes T activés ou favorise la prolifération et la survie de lymphocytes T activés.

La présente invention vise également à fournir un procédé d'identification d'agonistes ou  
15 d'antagonistes de ladite structure antigénique membranaire destinée à des applications thérapeutiques et/ou prophylactiques de différentes pathologies, en particulier dans la prévention et/ou le traitement de pathologies liées à une prolifération anormale de lymphocytes T activés, en  
20 particulier les myélomes à lymphocytes T, les éosinophilies à lymphocytes T, les maladies auto-immunes, les processus de rejets de greffe et les leucémies induites par certains rétrovirus, en particulier par les virus HTLV et HIV.

#### 25 Éléments caractéristiques de l'invention

La présente invention est relative à une nouvelle "structure antigénique membranaire" (dénommée ci-après 14C1), en particulier une glycoprotéine membranaire susceptible d'être spécifiquement reconnue par un ou  
30 plusieurs anticorps, cette dite structure présentant un poids moléculaire de 75 KD (identifiée par Western blot dans des conditions non réductrices telles qu'illustrées dans la Fig. 1) et est de nature glycoprotéique (dégradable par des protéases, en particulier par la papaïne et la  
35 protéinase K, et partiellement dégradable par un inhibiteur

de glycosylation tel que la tunikamycine); ladite "structure antigénique membranaire" étant exprimée

- dans les cellules APC (Antigen Presenting Cells), les lignées lymphoblastoïdes Daudi et Namalwa, et certaines
- 5 lignées promyélocytaires, en particulier les cellules HL60 et K562,
- dans les monocytes CD14+ de sang périphérique en réponse à un traitement de type inflammatoire (notamment induit par des lipopolysaccharides (LPS)),
- 10 - dans des lymphocytes T (CD3+) (en particulier en réponse à des traitements par les agents PHA et PMA, seul ou en association avec un ionophore de calcium),
- dans des sous-populations cellulaires exprimant le marqueur CD20 spécifique des lymphocytes B, et
- 15 - dans les cellules dendritiques.

La structure antigénique membranaire de l'invention est également identifiable par une reconnaissance spécifique au moyen d'un agoniste de cette structure antigénique membranaire qui est l'anticorps

20 monoclonal 14C1 dont l'hybridome porte le numéro d'accès LMBP 1666CB.

Les caractéristiques et les profils d'expression de ladite structure antigénique membranaire dans la lignée cellulaire sont également résumés dans le

25 tableau 1.

La structure antigénique de l'invention est également caractérisée par sa cinétique d'expression illustrée dans l'exemple 10, ainsi que par le phénotype des lymphocytes T activés exprimant ladite structure

30 antigénique membranaire et dont l'activation (par exemple par un agoniste) induit l'arrêt de la prolifération et l'apoptose desdits lymphocytes T activés.

L'apoptose des cellules est un phénomène cellulaire bien connu de mort cellulaire programmée. Ladite

35 structure antigénique membranaire de l'invention peut être

isolée de sa membrane par des techniques bien connues de l'homme de métier, ou produite par génie génétique et éventuellement déléetée de une ou plusieurs de ses portions, (en particulier de ses portions hydrophobes nécessaires pour son intégration dans des membranes cellulaires) et ensuite utilisée sous une forme suffisamment purifiée directement en tant qu'agent actif vaccinal ou en tant qu'adjuvant de vaccination pour induire une réponse immunitaire locale humorale ou cellulaire favorisant l'arrêt de la prolifération et l'apoptose de lymphocytes T activés pour des applications pharmaceutiques, en particulier celles mentionnées ci-dessous.

Un autre aspect de la présente invention est relatif à un ligand agoniste de ladite structure antigénique membranaire susceptible d'induire l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des lymphocytes T activés.

De préférence, cet agoniste est l'anticorps monoclonal 14C1 produit par l'hybridome portant le numéro d'accès LMBP 1666CB ou un anticorps polyclonal ou monoclonal chimérique ou humanisé et développé à partir de l'anticorps monoclonal 14C1 ou d'un fragment de cet anticorps.

La présente invention concerne également l'hybridome produisant ledit anticorps.

Un autre aspect de la présente invention est relatif à un ligand antagoniste d'une molécule agoniste vis-à-vis de ladite structure antigénique membranaire, en particulier un anticorps inhibant les phénomènes d'arrêt de prolifération des lymphocytes T et/ou inhibant l'apoptose desdits lymphocytes T activés, de manière à induire une activation du système immunitaire et à pouvoir être utilisés en tant qu'adjuvants de vaccin.

Ces dits agonistes ou antagonistes peuvent être également des anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou

des fragments d'anticorps dirigés spécifiquement contre certains épitopes.

On entend par fragments d'anticorps les portions hypervariables Fab, Fd, Fv, dAb, Fab', F(ab')<sub>2</sub>,...  
5 desdits anticorps qui peuvent être en particulier des immunoglobulines de type IgG1.

Lesdits agonistes ou antagonistes de l'invention peuvent être également des cellules, un ou plusieurs morceaux de membrane de cellules, tels que des  
10 récepteurs cellulaires susceptibles d'induire ou d'inhiber les mécanismes susmentionnés.

Un autre aspect de la présente invention concerne des anti-agonistes ou des anti-antagonistes, tels que des anticorps anti-idiotypiques ou des fragments  
15 d'anticorps anti-idiotypiques susceptibles d'être incorporés dans des dispositifs de diagnostic ou de suivi des pathologies susmentionnées pour caractériser et quantifier l'effet d'une éventuelle immuno-thérapie basée sur l'utilisation des agonistes ou antagonistes de  
20 l'invention.

Un tel dispositif de diagnostic ou du suivi comprend les différents éléments (éventuellement marqués) de l'invention, en particulier ladite structure antigénique membranaire de l'invention (éventuellement sous forme d'une  
25 cellule entière ou sous forme de fragments membranaires de cette cellule incorporant ladite structure membranaire de l'invention) présente en solution ou fixée sur un support solide, les agonistes ou antagonistes de l'invention ainsi que différents moyens et milieux destinés à quantifier et  
30 qualifier la réaction entre lesdits agonistes ou antagonistes et la structure antigénique membranaire de l'invention.

Un autre aspect de la présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un  
35 véhicule ou diluant pharmaceutique adéquat, ladite



structure antigénique membranaire de l'invention, un agoniste ou un antagoniste de ladite structure antigénique membranaire, en particulier une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de pathologies

5 liées à une prolifération anormale de lymphocytes T activés, en particulier les myélomes à lymphocytes T, les éosinophilies à lymphocytes T, les maladies auto-immunes, en particulier les pathologies choisies parmi le groupe constitué par les infections liées au SLE (Systemic Lupus

10 Erythematosus disease), le syndrome Gougerot-Sjögren (ou pathologie Sjögren), la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que les pathologies du type sarcoïdosis et l'ostéopenie, la spondylarthrite, le scleroderma, la sclérose en plaques, la sclérose amyotrophique latérale, l'hyperthyroïdisme, la

15 maladie d'Addison, l'anémie auto-immune hémolytique, la maladie de Crohn, le syndrome de Goddpasture, la maladie de Graves, la thyroïdie de Hashimoto, l'idiopathic purpura haemorrhagica, les diabètes insulino-dépendants, la myasthénie, le pemphigus vulgaris, l'anémie pernicieuse, le

20 poststreptococcal glomerulonephritis, le psoriasis et la stérilité spontanée, les processus de rejet de greffe (cellules, tissus ou organes de type hôte vs/greffe et greffe vs/hôte) et les leucémies induites par certains rétrovirus, en particulier les virus HTLV et HIV.

25 Dans la composition pharmaceutique de l'invention, le véhicule ou diluant pharmaceutique adéquat peut être tout support, solide, liquide, ... non toxique adapté pour être administré (*in vivo* ou *ex vivo*) au patient (y compris l'humain) selon la voie d'administration

30 choisie, qu'elle soit de type orale, intraveineuse, intrapéritonéale, intradermique, etc.

Les véhicules pharmaceutiques adéquats de l'invention sont des véhicules ou adjuvants communs, bien connus de l'homme du métier, qui peuvent également

35 comporter des éléments immunostimulateurs ou

immunoinhibiteurs susceptibles d'induire ou de supprimer une réponse immunitaire de type locale, cellulaire ou humorale, de manière à améliorer les propriétés de la composition pharmaceutique de l'invention. Le pourcentage  
5 de produit actif (structure antigénique membranaire, agoniste, antagoniste/véhicule pharmaceutique) peut varier selon des très larges gammes, limitées uniquement par la tolérance et par le niveau d'acceptation de la composition pharmaceutique selon l'invention par le patient. Les  
10 limites sont en particulier déterminées par la fréquence d'administration et les éventuels effets secondaires.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de la composition pharmaceutique selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à  
15 la prévention et/ou au traitement des pathologies susmentionnées, en particulier des pathologies impliquant la prolifération anormale de lymphocytes T. Ces pathologies ou maladies sont en particulier choisies parmi le groupe constitué par les myélomes à lymphocytes T, les  
20 éosinophilies à lymphocytes T, les maladies auto-immunes liées à l'apoptose, les processus de rejets de greffe et les leucémies induites par certains rétrovirus, en particulier par les virus HTLV-I ou HIV.

La présente invention concerne également un  
25 procédé de traitement thérapeutique ou prophylactique d'un animal, y compris l'humain, comportant l'administration de la composition pharmaceutique selon l'invention audit animal (y compris humain).

Un dernier aspect de la présente invention  
30 concerne un procédé d'identification (de screening) de molécules agonistes ou antagonistes de ladite structure antigénique membranaire de l'invention comprenant la mise en contact de ladite molécule susceptible d'être un agoniste ou un antagoniste avec ladite structure  
35 antigénique membranaire de l'invention, l'identification du

mécanisme biochimique induit par cette mise en contact (en particulier de la modification du phénotype d'un lymphocyte T activé et comprenant cette structure antigénique membranaire), et l'identification de ladite molécule en tant qu'agoniste ou antagoniste en fonction du mécanisme biochimique provoqué par ladite mise en contact.

Un dernier aspect de la présente invention concerne les molécules agonistes ou antagonistes identifiées par le procédé (de screening) de l'invention.

La présente invention sera décrite en détail dans les exemples non limitatifs repris ci-dessous.

#### Brève description de la figure

La figure 1 représente l'expression de l'antigène de l'invention détecté par Western Blot dans des conditions non réductrices à partir d'un extrait de cellule HL-60 traitée au PMA.

#### Description détaillée de l'invention

L'objet de l'invention est basé sur la découverte d'un anticorps monoclonal, dénommé ci-après "anticorps 14C1", qui, par interaction avec une protéine membranaire, est capable d'induire sélectivement l'arrêt de la prolifération et l'apoptose de lymphocytes T activés.

L'antigène membranaire reconnu par cet anticorps monoclonal est de nature glycoprotéique et est exprimé par un nombre restreint de types cellulaires tels que les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les monocytes traités au LPS et les lymphocytes T activés soit par des agents tels que le PMA et la PHA soit au cours d'une réaction lymphocytaire mixte. Le profil d'expression de l'antigène 14C1 indique qu'il ne correspond à aucun récepteur membranaire induisant l'apoptose déjà connu. Du fait de sa spécificité d'action, cet anticorps est un outil potentiellement très intéressant dans le traitement de

pathologies impliquant la prolifération anormale de lymphocytes T.

La version humanisée de cet anticorps 14C1 peut être obtenue selon les protocoles d'immunothérapies pour ces pathologies comme l'est par exemple l'anticorps humanisé dirigé contre la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 dans le traitement des leucémies induites par le virus HTLV-I (Waldmann et al. 1993).

L'anticorps monoclonal 14C1 est issu de la fusion entre des splénocytes de souris immunisées avec des cellules Daudi traitées à l'IFN- $\alpha$  et des cellules de myélome Sp2/0 (voir procédures expérimentales). Cet anticorps est une immunoglobuline de type IgG1. Il a été utilisé pour déterminer le spectre d'expression de l'antigène correspondant.

### EXEMPLES

#### Procédures expérimentales

##### 20 Lignées cellulaires et traitement par les interférons

Les cellules Daudi, Raji et Namalwa sont des lignées cellulaires humaines lymphoblastoïdes de type B (Lymphome de Burkitt). La lignée DIF8 est une lignée résistante aux effets des IFNs, dérivant de la lignée Daudi (Dron et al., 1983). Les lignées Jurkat, H9 et CEM sont des lignées lymphoblastoïdes T humaines. Les cellules K562 dérivent d'un myélome de leucémie chronique. Les cellules HL-60 sont de type promyélocytique. Les cellules U937 sont des cellules humaines de type monocytaire. Toutes ces lignées cellulaires sont cultivées en suspension à 37 °C, dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu RPMI-1640 (Gibco) complémenté avec 10% de FCS (Myoclone, Gibco), 10 mM Hepes pH 7,4, 1 mM de Na pyruvate, 50 u/ml de pénicilline, 50 mg/ml de streptomycine, 1% d'acides aminés non essentiels.

La lignée cellulaire HeLa dérive d'un carcinome du col utérin humain, est cultivée à 37 °C dans un atmosphère humidifié contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FCS, 2 mM de L-glutamine, 50 u/ml de pénicilline et 50 mg/ml de streptomycine. Les traitements aux IFNs sont effectués avec de l'IFN- $\alpha$ 2 et de l'IFN- $\gamma$  humains recombinants (provenant de la firme Boehringer Ingelheim) à une dose de 1000 unités/ml pendant 24 heures.

La différenciation des cellules HL-60 en macrophages est effectuée en incubant ces cellules à une densité de  $2 \cdot 10^5$  cellules/ml en présence de  $3,3 \cdot 10^{-8}$  M de PMA (Phorbol myristate acétate, Sigma) pendant 48 heures, ou en présence de  $5 \cdot 10^{-7}$  M de 1,25-dihydroxyvitamine D3 (VitD3) pendant 4 jours. Le cas échéant, ces cellules différenciées sont lavées 3 fois avec du PBS et sont remises en culture pour 24 heures en présence de 1000 u/ml d'IFN- $\alpha$ .

**Préparation des thymocytes:** Les cellules en suspension sont obtenues à partir de fragments de thymus normal provenant d'un adulte féminin au cours d'une intervention chirurgicale cardiaque.

**Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines membranaires induites par l'interféron- $\alpha$**

Des souris Balb/c ont été immunisées par injection intrapéritonéale de cellules Daudi traitées à l'IFN- $\alpha$  selon le protocole décrit dans un travail précédent (Deblandre et al., 1995). Toutefois, la méthode a été adaptée de manière à diminuer la proportion d'hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre des protéines membranaires constitutives des cellules Daudi. Ainsi, avant d'immuniser les souris avec des cellules Daudi traitées à l'IFN- $\alpha$ , elles

ont été soumises à une procédure d'immunosuppression. Celle-ci a consisté en injections répétées de cellules Daudi non traitées immédiatement suivies d'injections de cyclophosphamide. Cette drogue tue sélectivement les cellules  
5 qui se divisent et a été utilisée dans le but d'éliminer les lymphocytes B capables de reconnaître des épitopes constitutifs des cellules Daudi.

Les surnageants d'hybridomes obtenus ont été criblés sur base de leur capacité à réagir différenciellement  
10 avec des cellules Daudi traitées ou non à l'IFN- $\alpha$ . Ce criblage a été réalisé par immunofluorescence indirecte et analyse par cytométrie de flux. Les hybridomes positifs ont été clonés par des dilutions limites successives en présence de 100 U/ml d'IL-6 recombinante murine pour maintenir la  
15 sécrétion des immunoglobulines. Cette procédure a permis d'isoler 5 hybridomes produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines inductibles par l'IFN- $\alpha$  à la surface des cellules Daudi.

## 20 Préparation de populations de cellules à partir de sang périphérique

### Préparation de cellules mononuclées

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) sont préparées de la manière suivante. Le sang  
25 veineux de donneurs sains est centrifugé sur une lymphoprep (Nycomed) pendant 30 minutes à 2000 rpm. L'interface contenant les PBMCs est reprise et lavée 3 fois avec du PBS. Après le premier lavage, les cellules sont centrifugées à une vitesse de 2000 rpm pendant 10 min, et  
30 lors des deux derniers lavages, elles sont centrifugées à une vitesse de 1500 rpm pendant 15 min. Les PBMCs sont ensuite étalées sur une boîte en plastique pendant 2 heures à 37 °C. Les cellules non adhérentes sont principalement composées de lymphocytes B et T, alors que les cellules  
35 adhérentes sont essentiellement composées de monocytes.

Préparation de cellules dendritiques (DCs)

Des PBMCs sont étalées dans des puits de plaques à 6 puits à une densité de  $2.10^7$  cellules/puits dans 3 ml de milieu RPMI-1640 complet contenant 50  $\mu$ M de mercaptoéthanol. Après une incubation de 2 heures, les cellules non adhérentes sont éliminées et les cellules adhérentes sont lavées 4 fois avec du milieu de culture et remises en culture dans 3 ml de milieu contenant 800u/ml de GM-CSF (R&D system) et 1000 u/ml d'IL-4 humains recombinants (Genzyme). Tous les deux jours, 300  $\mu$ l de milieu sont prélevés et remplacés par le même volume de milieu frais contenant 2400 U de GM-CSF et 1500 U IL-4. Après 7 jours de traitement, la culture est essentiellement composée de cellules dendritiques telle que le démontre l'analyse par cytométrie de flux des cellules non adhérentes. La fraction enrichie en DC contient moins de 10% de cellules d'un autre type (cellules B ,T et NK).

**Maturation des DCs**

La maturation des DCs a été réalisée selon la voie de CD40 ou par une stimulation au LPS de E. coli (Sigma) ou par le TNF- $\alpha$  (PeproTech EC, USA).

Des cellules 3T6 transfectées avec le gène codant pour CD40L (Graf et al., Eur. J. Immunol. 1992) ont été utilisées comme source de CD40L pour induire les DCs par leur récepteur CD40. Les cellules 3T6 non transfectées ont été utilisées comme contrôle négatif. Les cellules 3T6 ( $5.10^4$ ) ont été cultivées en présence de  $2.10^5$  DCs dans un puits d'une plaque à 24 puits dans 1 ml de milieu de culture. Après 3 jours de culture, les cellules sont analysées pour l'expression d'antigènes de surface.

$2.10^5$  DCs sont cultivées dans un puits de plaque à 24 puits dans 1 ml de milieu en présence ou non de LPS (10 ng/ml) ou de TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). Après 3 jours de culture, la production d'IL-12 est mesurée dans les

surnameants par ELISA et l'expression des molécules à la surface des cellules est analysée par cytométrie de flux.

Dans le cas de la maturation des DCs en présence de l'anticorps 14C1,  $2.10^5$  DCs sont incubées en présence de 20  $\mu\text{g/ml}$  d'anticorps 14C1 ou d'une IgG1 contrôle dans 1 ml de milieu de culture dans un puits d'une plaque à 24 puits. Dans certaines expériences, on a mesuré l'effet de l'anticorps 14C1 sur les DCs en présence de LPS ou de CD40L.

10 Pour le dosage de l'IL-12, on a utilisé le Kit ELISA fourni par Biosource Europe qui détecte aussi bien la forme hétérodimérique (p70) que la forme homodimérique (p40-p40).

#### 15 Analyse par cytométrie de flux

L'expression de protéines membranaires peut être mesurée par immunofluorescence indirecte et analyse par cytométrie de flux.  $2.10^5$  cellules sont lavées 3 fois avec du PBS. Ensuite, elles sont incubées sur glace dans 20 50  $\mu\text{l}$  de PBS contenant 0,5% BSA, 0,01%  $\text{NaN}_3$ , en présence d'un excès d'anticorps, pendant 30 min. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS et incubées pour une seconde période de 30 min en présence de 100  $\mu\text{l}$  de GAMIg-FITC (Goat anti-mouse Ig conjugué à la fluorescéine) à une 25 concentration de 10 mg/ml (Sigma). Dans chaque expérience, un anticorps contrôle négatif est substitué aux anticorps d'intérêt pour mesurer le niveau basal de la fluorescence des cellules.

Dans les doubles colorations, la première 30 coloration suit les mêmes étapes comme décrit plus haut, et est suivie d'une seconde coloration par des anticorps conjugués à la phycoérythrine(PE).

Les anticorps utilisés au cours de cette étude sont les suivants. Anti-leu6 (CD1a), antiLeu-4 (CD3) 35 conjugués à la FITC, anti Leu-11a (CD16), anti Leu-12



(CD19)-PE IgG1, anti Leu-M3 (CD14)-PE IgG2b, anti Leu-4 (CD3)-PE, anti-Leu 15 (CD11b)-PE, anti BB-1/B7 (CD80)-PE, et HB-7 (CD38) IgG1. Tous ces anticorps ont été achetés à la firme Becton Dickinson. Les anticorps Anti-B7-2-PE 5 (CD86), anti-CD40-FITC et anti-CD83 ont été respectivement obtenus chez PharMingen et Biosource international. Les isotypes contrôles ont été obtenus chez Sigma. L'anticorps anti-HLA-DR a été obtenu à partir d'un hybridome provenant de la même fusion qui a généré l'anticorps 14C1 décrit 10 ci-dessus.

Traitement de cellules par des protéases ou de la tunicamycine

La sensibilité de l'antigène 14C1 aux 15 protéases a été testée par incubation des cellules HL-60 induites au PMA dans du PBS contenant 100µg/ml de protéinase K ou de Papaïne (Sigma) pendant 1 heure à 37 °C. Ensuite, les cellules sont lavées au PBS et incubées en présence d'anticorps 14C1 et puis d'un GAM-FITC. Les 20 cellules sont alors mises en présence d'iodure de propidium, et seules les cellules vivantes sont analysées par cytométrie de flux pour l'expression de l'antigène 14C1. La même procédure expérimentale a été utilisée pour déterminer si l'antigène 14C1 est glycosylé, sauf que les 25 cellules ont été traitées par de la tunicamycine (10 µg/ml) pendant 40 heures avant d'être analysées par cytométrie de flux avec l'anticorps 14C1.

Purification de lymphocytes T à partir de PBMCs

Sur le culot de  $15 \cdot 10^6$  PBMCs, on ajoute 30 800 µl de lymphokwik (R&D system), et la préparation est incubée à 37 °C avec une légère agitation. Après 30 minutes, les cellules sont lavées deux fois avec du milieu complet pour se débarrasser des cellules lysées. Le reste (1/3 des cellules engagées) des cellules est

essentiellement composé de lymphocytes, ce qui est confirmé par analyse cytométrique.

L'activation des lymphocytes T a été effectuée en les incubant à  $10^6$  cellules/ml en présence des activateurs suivants: PMA : 10 ng/ml, PHA : 10  $\mu$ g/ml, Al2387 : 100 ng/ml (Sigma).

#### Réaction lymphocytaire mixte (MLR)

$2.10^5$  lymphocytes T purifiés sont cultivés avec  $2.10^4$  DCs irradiées (3000 rad) en présence ou non de l'anticorps 14C1 à une concentration de 20  $\mu$ g/ml dans des puits de plaques à 96 puits. Les expériences sont toutes réalisées en triplicate. Après 5 jours de culture à 37 °C, la prolifération cellulaire est mesurée par incorporation de [ $^3$ H] thymidine (0,5  $\mu$  Ci/puits pendant les 16 dernières heures). Les surnageants de culture sont prélevés et les concentrations en IL-2 et IFN- $\gamma$  sont mesurées en utilisant les Kits provenant de Medgenix (Fleurus, Belgique) et Chromogenix (Mölndal, Suède).

#### Effet de l'anticorps 14C1 sur l'expression de protéines membranaires

Les cellules Jurkat sont traitées au PMA à une concentration de 10 ng/ml en présence ou non de l'anticorps 14C1 à une dose de 20  $\mu$ g/ml. Après une nuit d'incubation, les cellules sont lavées et analysées pour l'expression du récepteur de l'IL-2 (CD25) et de la molécule d'activation CD69. Les 2 anticorps reconnaissant ces protéines sont fournis par Becton Dickinson.

#### Mesure de la prolifération des lymphocytes T

Les lymphocytes T purifiés et les lignées cellulaires Jurkat et CEM sont activés ou non par du PMA et mis en culture dès le début de l'expérience en présence

d'une concentration de 20  $\mu\text{g/ml}$  d'anticorps 14C1 ou d'une même quantité d'IgG1 contrôle pendant 72 heures à 37 °C. La prolifération cellulaire est mesurée par la capacité des cellules à incorporer la [ $^3\text{H}$ ] thymidine ajoutée pendant les 5 16 dernières heures d'incubation. Ces expériences sont réalisées en triplicate.

#### Mesure de l'apoptose

Les cellules Jurkat traitées ou non au PMA  
10 sont incubées en présence ou non d'anticorps 14C1 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 48 heures ou en présence d'anticorps anti-Fas (100 ng/ml, Pharmingen) pendant 5 heures. Le profil de granulosité et la capacité de fixation de l'anexine par les cellules sont analysés. La phosphatidyl  
15 serine est reconnue spécifiquement par l'anexine. Ensuite, les cellules sont lavées et colorées en ajoutant 10  $\mu\text{l}$  d'anexine couplée au FITC et 10  $\mu\text{l}$  d'iodure de propidium (Kit R&D system). Le mélange est incubé 30 min à 1 heure et les cellules colorées sont analysées par FACS (Becton  
20 Dickinson).

#### Exemple 1 : Profil d'expression de l'antigène 14C1

Les types cellulaires capables d'exprimer l'antigène reconnu par l'anticorps 14C1 ont été déterminés  
25 par cytométrie de flux. Cet antigène est exprimé à la surface de lignées cellulaires telles que les cellules Daudi, Namalwa, HL60 et K562 alors qu'il n'est pas détecté sur les cellules épithéliales (HeLa) ou lymphocytaires T (CEM, Jurkat et H9) testées. Son inductibilité par les IFNs  
30 semble être spécifique à la lignée lymphocytaire Daudi pour laquelle on a observé une induction claire en réponse à l'IFN- $\alpha$ .

Vu la faible expression de l'antigène 14C1 sur les cellules HL-60, son taux d'expression a été  
35 déterminé après différenciation de ces cellules par un

traitement au PMA ou à la vitamine D3. En effet, les cellules de la lignée promyélocytique HL-60 peuvent se différencier en macrophages en réponse à un traitement par le PMA (phorbol-12 myristate-13)acétate et par la 1,2 dihydroxyvitamine D3 (VitD3). Les cellules différenciées changent de morphologie et de phénotype. Elles deviennent adhérentes au plastique et augmentent l'expression de molécules d'adhésion telles que les protéines de la famille des intégrines CD11a (LFA-1) et CD11b (MAC-1) (Pedrinaci et al., 1989, Back et al., 1992). D'un point de vue fonctionnel, ces cellules différenciées acquièrent la capacité de phagocytose. De plus, après activation par l'IFN- $\gamma$ , elles acquièrent le potentiel de transmettre un signal co-stimulateur aux lymphocytes T (Shinbori et al., 1992). L'addition de PMA ou de vitamine D3 à une culture de cellules HL-60 induit la surexpression de l'antigène 14C1 après 48h de traitement. De plus, un traitement supplémentaire de ces cellules HL60 différenciées par les IFNs  $\alpha$  ou  $\gamma$  augmente encore légèrement le nombre de molécules d'antigène 14C1 à la surface des cellules. La différenciation des cellules HL60 en macrophages est vérifiée par la mesure de la surexpression du marqueur myéloïde CD11b (Murao et al., 1994).

## 25 Exemple 2 : Nature chimique de l'antigène 14C1

Dans le but de déterminer si l'antigène 14C1 est de nature protéique, des expériences ont été réalisées dans lesquelles des cellules HL-60 différenciées par le PMA ont été traitées par deux protéases, la papaïne et la protéinase K. Après ces traitements protéolytiques, le taux d'antigène 14C1 à la surface des cellules a été mesuré par cytométrie de flux. Le traitement des cellules à la papaïne ou à la protéinase K abolit la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps 14C1. De même, un traitement des cellules par la tunikamicyne, un inhibiteur de glycosylation, réduit

partiellement la reconnaissance de l'antigène 14C1 par l'anticorps.

Exemple 3 : Profil d'expression de l'antigène 14C1 par les

5 cellules du sang périphérique

Comme l'antigène 14C1 n'est exprimé que par un nombre restreint de types cellulaires, les populations cellulaires du sang périphérique exprimant l'antigène 14C1 ont été déterminées. Le sang périphérique est centrifugé  
10 sur une lymphoprep pour séparer les cellules mononuclées (PBMC), des globules rouges. Ces PBMC sont formées essentiellement de lymphocytes B, T et monocytes. Les différentes populations de leucocytes circulants sont caractérisées par l'expression de marqueurs membranaires  
15 spécifiques. Par double coloration des cellules avec un de ces marqueurs spécifiques et l'anticorps 14C1, il est possible de mesurer l'expression de l'antigène 14C1 dans les différentes populations cellulaires du sang périphérique par cytométrie de flux. Ainsi, la sous-  
20 population exprimant le marqueur CD20 spécifique des lymphocytes B, exprime l'antigène 14C1. Le taux d'expression de l'antigène 14C1 par les lymphocytes B est du même ordre de grandeur que celui trouvé dans les cellules Daudi. Cependant, un traitement des lymphocytes B  
25 par l'IFN- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$  n'augmente pas l'expression de l'antigène 14C1.

Les autres sous-populations de sang périphérique, les lymphocytes T (CD3+) et les monocytes (CD14+) n'expriment pas l'antigène 14C1 à un taux  
30 détectable par cytométrie de flux. De même, un traitement par les IFNs ne semble pas augmenter l'expression de l'antigène. Par ailleurs, aucune augmentation du taux d'expression de l'antigène 14C1 n'a été observée suite à l'activation des cellules B par l'IL-4, le PMA ou le SAC,  
35 alors qu'une induction de l'expression de Fc $\epsilon$ RII/CD23 a

bien été observée, conformément aux données de la littérature (Defrance et al., 1987, Clark et al., 1989, Law et al., 1990).

Le traitement des monocytes (CD14+) de sang  
5 périphérique par des lipopolysaccharides (LPS) pendant 48 heures induit l'expression de l'antigène 14C1. De même, l'expression de l'antigène 14C1 est induite dans les lymphocytes T (CD3+) en réponse à des traitements par différents agents comme la PHA, le PMA, seul ou en  
10 association avec un ionophore du calcium.

Exemple 4 : Expression de l'antigène 14C1 par les cellules dendritiques

Comme décrit plus haut, l'antigène 14C1 est  
15 exprimé par les lymphocytes B, les macrophages activés par un traitement au LPS, et les lymphocytes T activés. Ces cellules possèdent la caractéristique commune d'être des cellules présentatrices d'antigène (cellules accessoires). Les cellules dendritiques sont également spécialisées dans  
20 cette fonction de présentation d'antigène. A partir de cellules adhérentes provenant du sang périphérique, incubées en présence des cytokines IL-4 et GM-CSF pendant 7 jours, on a différencié des cellules dendritiques (Romani et al. 1994) qui constituent une population  
25 morphologiquement homogène. De plus, ces cellules sont toutes dans le même état de maturation (Romani and Steiman 1994, Salusto and Lanzavecchia 1994).

Les cellules dendritiques (ou DCs) expriment à forte densité les molécules du CMH de classes I et II et  
30 sont caractérisées par l'expression de molécules co-stimulatrices telles que B7-1 et B7-2. Leur fonction majeure est la capacité de stimuler les lymphocytes T par présentation d'antigène, étudiée par des expériences dans lesquelles la prolifération de lymphocytes T est mesurée  
35 suite à leur incubation en présence de DCs préalablement

irradiées. Ce type d'expérience est appelé une MLR pour "Mixed Lymphocyte Reaction".

Des DCs générées selon le protocole décrit par Romani et al. ont un profil phénotypique correspond à celui des cellules dendritiques (à savoir l'expression des molécules du CMH de type HLA-DR ainsi que des protéines co-stimulatrices B7-1, B7-2 et CD1a) et une identification de la protéine MHC cII-like.

Les cellules dendritiques générées selon cette méthode constituent une population de cellules dendritiques immatures, qui ont la fonction de présenter des antigènes plutôt que de stimuler la prolifération des lymphocytes T. Leur maturation peut être induite en les incubant en présence de LPS, de TNF- $\alpha$  ou de CD40L (Sallusto and Lanzavecchia 1995). En réponse à ces stimuli, les cellules surexpriment les molécules co-stimulatrices nécessaires à l'activation des lymphocytes T (Sallusto et al., 1995, Caux et al. 1994).

L'antigène 14C1 est exprimé par ces cellules dendritiques.

L'expression de l'antigène 14C1 en présence de TNF- $\alpha$  ou de LPS pendant 24 heures ne semble pas être modifiée suite à ces traitements, alors qu'ils induisent la surexpression des molécules B7-1 et HLA-DR et réduisent celle de la protéine MHC cII-like CD1a (Sallusto et Lanzavecchia, 1995).

L'interaction des DCs exprimant la protéine CD40, membre de la famille du récepteur du TNF, avec des cellules T exprimant le ligand de CD40 (CD40L) permet également la maturation des DCs (Caux et al. 1994). La culture de DCs en présence de cellules 3T6 exprimant le ligand de CD40 permet d'activer les DCs par la voie CD40. Dans les expériences, des DCs générées selon le protocole de Romani (1994), ont été cultivées en présence de cellules fibroblastiques exprimant ou non le CD40L. Ces populations

de DCs ont ensuite été testées pour mesurer leur différence phénotypique pour les marqueur CD1a, B7-1, HLA-DR et l'antigène 14C1.

La maturation des DCs par la voie CD40 ne  
5 semble pas moduler le nombre de molécules d'antigène 14C1 à la surface des cellules dendritiques. Alors que les molécules HLA-DR et B7 sont surexprimées, le marqueur CD1a semble être sous-exprimé après la maturation des cellules, comme rapporté auparavant dans la littérature (Caux et al.  
10 1994, Sallusto et Lanzavecchia, 1995).

Comme l'antigène 14C1 présente une similitude dans son profil d'expression avec les molécules de la famille CD1 (CD1a, CD1b, CD1c) (Calabri et al., 1991, Small et al., 1987) et comme les molécules CD1 sont exprimées sur  
15 les thymocytes (Martin et al., 1987), l'expression de ces molécules a été comparée à celle de l'antigène 14C1 sur des thymocytes doublement positifs CD4+/CD8+. Contrairement aux molécules CD1, l'antigène 14C1 n'est pas exprimé dans les thymocytes.

20

#### Exemple 5 : Effet de l'anticorps 14C1 dans une réaction allogénique mixte

La réaction lymphocytaire mixte (MLR) est unilatérale au sens où l'une des deux populations (la  
25 population stimulante) est inactivée par irradiation. La MLR se distingue des réactions antigéniques classiques par le fait que ce sont des molécules du CMH de classe I et II, exprimées à la surface des cellules stimulatrices qui jouent le rôle d'antigènes. D'une certaine manière, les  
30 molécules du CMH allogénique mimeraient la présentation d'un motif antigénique dans un contexte de CMH autologue.

Des populations de lymphocytes T purifiées ont donc été mises en présence de cellules dendritiques irradiées, stimulatrices de la réaction allogénique, en  
35 présence ou non de l'anticorps 14C1. La prolifération des



lymphocytes T résultant de cette activation allogénique a été évaluée par incorporation de thymidine traitée pendant les 15 dernières heures de culture. Ces expériences montrent que l'anticorps 14C1 bloque dans une large mesure (jusqu'à 56%) la stimulation de la prolifération des lymphocytes T par les cellules dendritiques.

Ces résultats suggèrent que l'anticorps 14C1 interférerait dans la mise en place du signal d'activation des lymphocytes T.

10

Exemple 6 : Action de l'anticorps 14C1 sur les cellules lymphoblastoïdes

L'étude de l'effet inhibiteur de l'anticorps 14C1 sur l'activation des lymphocytes T a ensuite été réalisée en utilisant des lignées lymphocytaires leucémiques telles que les cellules Jurkat et CEM.

Les cellules T du sang périphérique sont activées en plusieurs étapes. Les premiers événements de l'activation permettent l'expression du récepteur de l'IL-2 et la production d'IL-2, les événements plus tardifs permettent de faire sortir les cellules de leur phase de quiescence.

La croissance des cellules Jurkat mime probablement uniquement les premières étapes de l'activation. Ces lignées cellulaires n'expriment l'antigène 14C1 qu'après activation.

L'activation des cellules a été induite par un traitement au PMA seul ou en association soit avec l'ionophore de calcium A12387, soit avec la PHA. La prolifération des cellules suite à leur activation a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée après 3 jours de culture en présence ou non de l'anticorps 14C1. Ce type d'expérience montre que lorsque les cellules activées sont mises en présence de l'anticorps 14C1, elles cessent de proliférer, contrairement aux cellules activées mises en

présence d'un anticorps IgG1 contrôle, qui continuent à proliférer de la même manière qu'en absence d'anticorps. Il faut noter que l'activation des cellules s'accompagne d'une diminution de l'ordre de 30% de leur prolifération. Ceci

5 résulte d'un phénomène de mort cellulaire induit par activation aussi appelée AICD pour "Activation-Induced Cell Death". Cette AICD résulte de l'incubation des cellules T en présence de différents stimuli tels que des lectines mitogènes comme la phytohématoglutinine (PHA) ou un

10 anticorps anti-CD3 dirigé contre le complexe TCR, qui engage les lymphocytes T à entrer en phase de mort cellulaire (Kabelitz et al., 1993).

Les expériences indiquent que l'anticorps 14C1 est capable de bloquer l'activation de la

15 prolifération des lymphocytes T activés quel que soit le mode d'activation de ces cellules. L'anticorps 14C1 n'a pas d'effet sur les lymphocytes T non activés, ce qui corrèle avec le fait que ces cellules n'expriment pas l'antigène 14C1 en absence d'activation.

20 L'effet de l'anticorps a été étudié sur des cellules qui expriment l'antigène 14C1 de manière constitutive telles que les cellules Daudi, et sur des cellules qui l'expriment à forte densité telle que la lignée promyélocytique HL-60 après différenciation en

25 macrophages. Dans les différentes conditions d'incubation testées, l'anticorps 14C1 n'a pas d'effet sur les cellules Daudi traitées ou non par les IFN  $\alpha$  ou  $\gamma$ . De même, l'anticorps 14C1 n'induit aucune diminution de la prolifération des cellules HL-60 après leur

30 différenciation. Ces résultats indiquent que l'expression de l'antigène 14C1 n'est pas suffisante pour observer l'effet anti-prolifératif de l'anticorps 14C1.

L'activation des lymphocytes T par les esters de phorbol induit l'expression très rapide de molécules

35 telles que le marqueur précoce de lymphocytes T activés

Leu-23 (CD69) et la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25) (Pimentel-Muinos et al., 1994).

La présence de l'anticorps 14C1 dans la culture inhibe dans une large mesure l'induction de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (CD25). De même, la surexpression de CD69 est également abolie par l'anticorps 14C1. Ces résultats indiquent que l'anticorps 14C1 bloque des mécanismes précoces de l'activation des lymphocytes T. En effet, il empêche leur passage d'une phase de quiescence à une phase d'activation qui nécessite l'expression du récepteur IL-2, étape-clé de l'activation des lymphocytes T.

Exemple 7 : L'anticorps 14C1 induit l'apoptose des cellules Jurkat traitées par le PMA

L'entrée d'une cellule en apoptose se caractérise notamment par un changement de la polarité de sa membrane plasmique (Martin et al., 1995). Ce changement de polarité de la membrane plasmique se manifeste par une externalisation de phosphatidylsérine (PS). Cette modification au niveau de la membrane cellulaire peut être visualisée par cytométrie de flux en colorant les cellules avec de l'anexine fluorescente qui a la propriété d'interagir spécifiquement avec la phosphatidylsérine. Des cellules Jurkat traitées par le PMA ont été testées en présence ou en absence de l'anticorps 14C1 pendant 48 heures. En parallèle, des cellules Jurkat traitées par le PMA ont été mises en présence d'un anticorps agoniste dirigé contre Fas, un membre de la famille des récepteurs du TNF capable d'induire l'apoptose des cellules par liaison de son ligand (Oehm et al., 1992). Ces cellules ont été colorées par de l'anexine couplée au FITC et analysées par cytométrie de flux. L'incubation des cellules Jurkat activées en présence de l'anticorps 14C1 et des cellules Jurkat non activées en présence de l'anticorps anti-Fas

entraînent l'apparition d'une population (environ 70% des cellules) capable de fixer l'anexine alors qu'en absence de traitement des cellules par le PMA ou en absence de l'anticorps 14C1, les cellules ne fixent pas l'anexine.

5 Cependant, alors que l'anticorps anti-Fas induit une augmentation de la granulosité des cellules Jurkat non activées, ce changement n'apparaît en réponse à l'anticorps 14C1 qu'après activation des cellules par le PMA. L'incubation des cellules Jurkat en présence de l'anticorps

10 14C1 sans agent d'activation n'induit pas le changement de la granulosité cellulaire, ce qui est en corrélation avec le fait que les cellules non activées n'expriment pas l'antigène 14C1.

L'entrée des cellules en apoptose

15 s'accompagne également d'une perméabilisation de la membrane cellulaire. Cette perméabilisation peut être évaluée par la capacité des cellules à internaliser l'iodure de propidium, agent qui s'intercale entre les deux brins d'ADN. Lorsque des cellules Jurkat sont traitées au

20 PMA en présence de l'anticorps 14C1, on observe l'apparition d'une population de cellules colorées par l'iodure de propidium. Cependant, la perméabilisation des cellules Jurkat activées et mises en présence de l'anticorps 14C1 présente une cinétique significativement

25 plus lente que celle provoquée par l'anticorps anti-Fas. En effet, alors que la perméabilisation des cellules induite par l'anticorps anti-Fas se manifeste après une incubation de 5 heures en présence de cet anticorps, la perméabilisation induite par l'anticorps 14C1 nécessite une

30 incubation d'au moins 48 heures. L'ensemble de ces résultats indique que l'anticorps 14C1 est capable de bloquer la prolifération des lymphocytes T activés et dans une phase plus tardive, d'induire leur entrée en apoptose.

Exemple 8 : Effet de l'anticorps 14C1 sur les lymphocytes T du sang périphérique

Des lymphocytes T ont été purifiés à partir de PBMCs de donneurs sains adultes, et ensuite stimulées  
5 par un traitement à la PHA ou au PMA en combinaison avec l'ionophore de calcium (en présence ou en absence de l'anticorps 14C1 pendant 24 heures).

La prolifération des cellules ainsi que leur production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , deux cytokines dont la  
10 synthèse est induite en réponse à l'activation des lymphocytes T, ont été mesurées. La présence de l'anticorps 14C1 dans le milieu de culture induit une diminution très importante de la prolifération des lymphocytes T en réponse aux deux traitements. De même, la production des deux  
15 cytokines induite par un traitement des cellules à la PHA est fortement inhibée par l'anticorps 14C1 (90% d'inhibition pour l'IL-2 et 73% pour l'IFN- $\gamma$ ).

Exemple 9 : Effet de l'anticorps 14C1 sur les cellules dendritiques

L'activation des lymphocytes T requiert non seulement le signal formé par le complexe de l'antigène en association avec une molécule du CMH mais aussi un signal co-stimulateur médié par les molécules "co-stimulatrices"  
25 appelées B7-1 et B7-2.

L'action de l'anticorps 14C1 sur l'expression des molécules B7-1, B7-2 et du marqueur d'activation des DCs, le CD83, (Zhou et al., 1995) dans les cellules dendritiques a été étudiée.

Des cellules dendritiques ont été générées à partir de cellules adhérentes du sang périphérique incubées pendant 7 jours en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Ces cellules ont ensuite été incubées pendant 3 jours en présence ou en absence de l'anticorps 14C1. Comme le  
35 montrent les analyses de coloration et de cytométrie de

flux, l'anticorps 14C1 induit une surexpression des molécules co-stimulatrices B7-1 et B7-2 ainsi que des molécules CD40 et induit une surexpression du marqueur d'activation CD83. Cette surexpression des différentes  
5 molécules est comparable à celle observée au cours d'une maturation des DCs selon la voie CD40 ou LPS.

L'anticorps 14C1 ne provoque pas une augmentation supplémentaire de l'expression des molécules B7-1, B7-2, CD40 ou CD83 dans les DCs après stimulation par  
10 les voies LPS ou CD40, probablement en raison du fait que l'expression de ces molécules est déjà maximale après l'activation des DCs.

On peut conclure de ces résultats que l'interaction de l'anticorps 14C1 avec son antigène stimule  
15 la maturation des cellules dendritiques de manière comparable à la maturation de ces cellules par d'autres voies d'activation. Cette maturation se manifeste par une augmentation de l'expression des molécules co-stimulatrices, des molécules du complexe majeur  
20 d'histocompatibilité et du marqueur d'activation des DCs, le CD83.

Les cellules dendritiques matures sont capables de produire la cytokine IL-12 (Macatonia et al., 1995), qui agit sur les lymphocytes T et les cellules NK,  
25 en augmentant leur production en cytokines, leur prolifération et leur cytotoxicité. Pour vérifier que l'anticorps 14C1 induit une maturation des DCs, leur production d'IL-12 en présence ou non d'anticorps 14C1 a été mesurée. On observe qu'en l'absence de traitement,  
30 l'anticorps 14C1 induit une production détectable d'IL-12. De plus, l'anticorps 14C1 provoque une augmentation significative de la production d'IL-12 par des DCs stimulées par les voies LPS ou CD40. Ces résultats indiquent que la liaison de l'anticorps 14C1 sur les DCs

facilite leur maturation et induirait un changement fonctionnel des cellules.

Exemple 10 : Analyse de la cinétique d'expression de  
5 l'antigène 14C1 dans les lignées cellulaires Jurkat et HL-  
60 60

L'expression de l'antigène 14C1 à la surface des cellules T peut être induite par différents agents comme les esters de phorbol, la phytohémagglutinine (PHA),  
10 mais aussi lors d'une réaction lymphocytaire mixte en présence de cellules dendritiques irradiées. La cinétique d'expression de la protéine 14C1 a été étudiée afin de déterminer si l'apparition de cette protéine à la surface des lymphocytes T est un événement précoce ou tardif lors  
15 de l'activation.

Par cytométrie de flux, on mesure l'apparition de la protéine 14C1 à la surface des cellules Jurkat au cours du temps, suite à un traitement par du PMA (10ng/ml) et des anticorps agonistes anti-CD3 ou CD-28.

20 Ces expériences montrent que la protéine 14C1 est détectable après une heure de stimulation et est exprimée à son taux maximal après 4 heures de traitement. Ultérieurement, sa synthèse décroît pour atteindre un niveau constant mais faible qui est maintenu jusqu'à 48  
25 heures de stimulation. L'expression de l'antigène 14C1 est induite avec la même cinétique par des anticorps agonistes anti-CD3 et anti-CD28.

L'ensemble de ces résultats indique que l'expression de l'antigène 14C1 est un événement précoce  
30 lors de l'activation des lymphocytes T.

L'analyse du profil d'expression de la protéine membranaire 14C1 avait montré que des cellules promyéломonocytiques HL-60 accumulent des quantités importantes de la protéine 14C1 à leur surface suite à leur  
35 différenciation par un traitement au PMA pendant 72 heures.

L'expression maximale de la protéine a lieu après 48 heures d'incubation des cellules en présence de PMA.

Exemple 11 : Détection de l'expression de l'antigène 14C1  
5 par la technique de Western Blot.

L'expression de l'antigène est détectable par Western Blot uniquement lorsque l'expérience est réalisée dans des conditions non réductrices.

10 Comme le montre la Fig. 1, une bande à un poids moléculaire de 75 kDa apparaît dans les fractions du bas d'un gradient, obtenues à partir d'un extrait de cellules HL-60 (n°ATCC: CCL240) lysées avec du NP-40 (2%) et qui est ensuite fractionné sur gradient de saccharose,  
15 lesdites cellules HL-60 étant traitées au PMA pendant 48 heures.

Aucun signal n'est détectable dans la piste correspondant à l'extrait de cellules HL-60 non traitées.

Lorsque le Western blot est révélé avec une  
20 IgG1 contrôle, aucun signal spécifique n'est observé.

L'anticorps de l'invention est  
avantageusement produit par un hybridome ayant fait l'objet d'un dépôt de micro-organisme selon le Traité de Budapest et ayant été déposé le 07/07/1998 auprès de la Collection  
25 LMBP (BCCM-LMBP Plasmid Collection, Laboratorium voor Moleculaire Biologie, Universiteit Gent KL, Ledenganckstraat, 35 B-9000 Gent) sous le numéro d'accès LMBP 1666CB.



**Expression et inducibilité de l'antigène 14C1 sur lignées cellulaires établies.**  
**Analyses par cytométrie de flux**

Lignées cellulaires		Inducteurs				anti-CD3	anti-CD28
		NI	IFN- $\alpha$ (1000 UI/ml, 24h)	IFN- $\gamma$ (1000 UI/ml, 24h)	PMA		
Lignées lymphoblastoïdes B	Raji	-	-	-	ND	ND	ND
	Daudi	+	+(+)	+	+	ND	ND
	Namalwa	(+)	+	(+)	ND	ND	ND
	DIF8	-	-	-	ND	ND	ND
Lignées lymphoblastoïdes T	CEM	-	-	-	(+)	ND	ND
	Jurkat	-	-	-	+	++	++
	H9	-	-	-	ND	ND	ND
Lignées promyelomonocytiques	HL60	(+)	(+)	(+)	++	ND	ND
	CESS	-	-	-	ND	ND	ND
	U937	-	-	-	ND	ND	ND
	K562	(+)	(+)	(+)	ND	ND	ND
Lignée de carcinome utérin	HeLa	-	-	-	ND	ND	ND

(-) correspond à une fluorescence indétectable, (+) à une fluorescence d'une valeur entre 3 et 10, + à une valeur entre 10 et 20, ++ à une valeur entre 20 et 30 et +++ à une valeur supérieure à 30. Dose de PMA utilisée: 10 ng/ml sauf pour les HL-60: 50 ng/ml. Temps de traitement: 4 heures sauf pour les HL-60 (48 heures) et les CEM (24 heures).

Expression et inducibilité de l'antigène 14C1 sur des cellules primaires.  
Analyses par cytométrie de flux

	Inducteurs								
	NI	IFN- $\alpha$ (1000 UI/ml, 24h)	IFN- $\gamma$ (1000 UI/ml, 24h)	PMA (10 ng/ml, 24h)	PHA (10 $\mu$ g/ml, 24h)	SAC (100ng/ml, 72h)	LPS (10 ng/ml, 48h)	TNF (20ng/ml, 40h)	CD40L
Lymphocytes B	+	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND
Lymphocytes T	-	-	-	(+)	(+)	ND	ND	ND	ND
Monocytes	-	-	-	ND	ND	ND	+	ND	ND
Cellules dendritiques	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+
Thymocytes	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(-) correspond à une fluorescence indétectable, (+) à une fluorescence d'une valeur entre 3 et 10, + à une valeur entre 10 et 20, ++ à une valeur entre 20 et 30 et +++ à une valeur supérieure à 30. ND: not determined. La maturation des cellules dendritiques par CD40L est réalisée par une incubation avec des cellules 3T6 exprimant le CD40L.

**Modulation de l'expression de certains marqueur des cellules  
dendritiques  
par l'anticorps 14C1.**

Traitement des cellules

	NI*	LPS	IgG1	Am14C1	CD40L
B7-1	+	++	+	+(+)	+++
B7-2	++	+++	++	++	+++
CD40	+	+	+	+	+(+)
CD83	(+)	+	(+)	+	+

Les DC sont cultivées en présence des inducteurs suivants (LPS (10ng/ml), CD40L, 14C1 (20µg/ml). Après 72h de culture, les cellules sont lavées et analysées par cytométrie de flux pour leur expression des molécules de surface indiquées dans le tableau.

NI\* : cellules non traitées

REFERENCES

1. Back, A.L. et al., J. Immunol. 148, pp. 710-714 (1992).
2. Caux, C. et al., J. Exp. Med. 180, pp. 1263-1272 (1994)
- 5 3. Calabri, F. et Bradbury, A., Tissue Antigen 37, pp. 1-9 (1991)
4. Clark, E. et al., J. Immunol. 143, pp. 3873-3880 (1989)
5. Cohen, J.J. et Duke, R.C., Ann. Rev. Immunol. 10, pp. 267-93 (1992)
- 10 6. Deblandre, G. et al., J. Biol. Chem. 270, pp. 23860-23866 (1995)
7. Defrance, T. et al., J. Exp. Med. 165, pp. 1459-1467 (1987)
8. Dron, M. et al., Mol. Cell. Biol. 6, pp. 1374-1378 (1986)
- 15 9. Graf, D. et al., Eur. J. Immunol. 22, pp. 3191-31994 (1992)
10. Janeway, C. et Travers, P., Immuno Biology. The immune system in health and disease. Eds. Blackwell Scientific publications. Oxford (1994)
- 20 11. Kabelitz, D. et al., Immunol. Today 14, pp. 338-339 (1993)
12. Law, C.L. et al., Leukemia 4, pp. 732-738 (1990)
13. Martin, L.H. et al., Immunology 84, pp. 9189-9193 (1987)
- 25 14. Macatonia, S.E. et al., J. Immunol. 154, pp. 5071-5079 (1995)
15. Murao, S. et al, Editor Julio E Celis,. Cell Biology A Laboratory Handbook Academic Press 1, pp. 207-211 (1994)
- 30 16. Oehm, A. et al., J. Biol. Chem. 267, pp. 10709-10715 (1992)
17. Pimentel-Muinos, F.X. et al., J. Biol. Chem. 269, pp. 24424-24429 (1994)
- 35 18. Pedrinaci, S. et al, Hybridoma 8, pp. 13-23 (1989)

19. Romani, N. et al, J. Exp. Med. 180, pp. 83-93  
(1994)
20. Sallusto, F. et al., J. Exp. Med. 182, pp. 389-400  
(1995)
- 5 21. Sallusto, F. et Lanzavecchia, A., J. Exp. Med. 179, pp.  
1109-1118 (1994)
22. Small, T.N. et al., J. Immunol. 138, pp. 2864-2868  
(1987)
23. Sytwu, H.K. et al., Immunity 5, pp. 17-30 (1996)
- 10 24. Waldmann, T.A. et al., Blood 82, pp. 1701-1712  
(1993)
25. Zhou, L.J. et Tedder, T.F., J. Immunol. 154, pp.  
3821-3835 (1995)

REVENDEICATIONS

1. Structure antigénique membranaire, caractérisée en ce qu'elle est de nature glycoprotéique et présente un poids moléculaire de 75 KD, en ce qu'elle est  
5 exprimée :

- dans des cellules APC (Antigen Presenting Cells), en particulier dans les lignées lymphoblastoïdes Daudi et Namalwa et dans certaines lignées promyélocytaires, en particulier les cellules HL60 et K562,
- 10 - dans les monocytes CD14+ de sang périphérique en réponse à un traitement de type inflammatoire,
- dans des lymphocytes T (CD3+), en réponse à des traitements par les agents PHA et PMA, seul ou en association avec un ionophore de calcium,
- 15 - dans des sous-populations cellulaires exprimant le marqueur CD20 spécifique des lymphocytes B, et
- dans les cellules dendritiques, et en ce que son activation induit l'arrêt de la prolifération et l'apoptose de lymphocytes T activés.

20 2. Agoniste de la structure antigénique membranaire selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il induit l'arrêt de la prolifération et l'apoptose de lymphocytes T activés.

25 3. Agoniste selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est un anticorps.

4. Agoniste selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'anticorps est produit par l'hybridome portant le numéro d'accès LMBP 1666CB.

30 5. Hybridome produisant l'anticorps monoclonal selon la revendication 4 et portant le numéro d'accès LMBP 1666CB.

6. Antagoniste de la structure antigénique membranaire selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il favorise la prolifération et la survie de lymphocytes  
35 T activés.

7. Composition pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique adéquat et la structure antigénique membranaire selon la revendication 1, l'agoniste selon l'une quelconque des revendications 2 à 4 et/ou  
5 l'antagoniste selon la revendication 6.

8. Utilisation de la composition pharmaceutique selon la revendication 7 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement de pathologies liées à une prolifération anormale de  
10 lymphocytes T activés.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que les pathologies liées à une prolifération anormale de lymphocytes T activés sont choisies parmi le groupe constitué par les myélomes à  
15 lymphocytes T, les éosinophilies à lymphocytes T, les maladies auto-immunes, les processus de rejets de greffe et les leucémies induites par certains rétrovirus, en particulier par les virus HTLV et HIV.

10. Dispositif de diagnostic et/ou de suivi d'une pathologie liée à une prolifération anormale de lymphocytes T, comprenant la structure antigénique membranaire selon la revendication 1, un agoniste selon l'une quelconque des revendications 2 à 4 et/ou un antagoniste selon la revendication 6, éventuellement  
25 marqué(s).

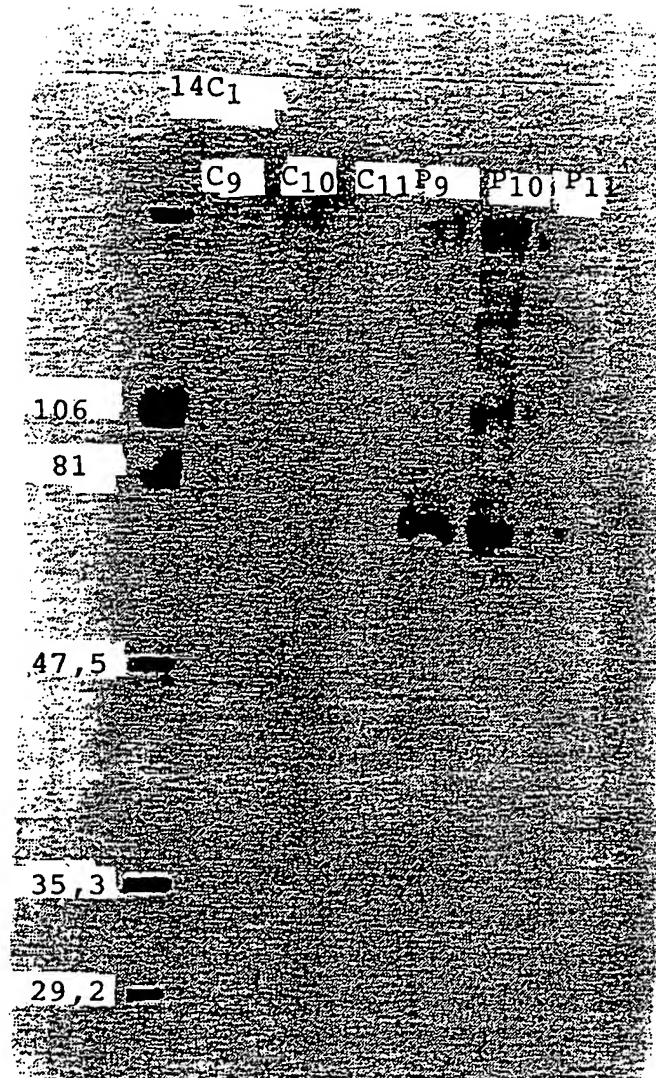
11. Procédé d'identification de molécule (connue ou non connue) susceptible d'agir en tant qu'agoniste ou antagoniste de la structure antigénique membranaire selon la revendication 1, comprenant la mise en  
30 contact de ladite molécule avec ladite structure antigénique membranaire, l'identification du mécanisme biochimique induit par cette mise en contact, en particulier la modification d'un phénotype d'un lymphocyte T activé comprenant cette dite structure antigénique  
35 membranaire, et l'identification de ladite molécule en tant

qu'agoniste ou en tant qu'antagoniste en fonction des mécanismes biochimiques provoqués par ladite mise en contact, et susceptible d'inhiber la prolifération et l'apoptose de lymphocytes T activés ou de favoriser la  
5 prolifération et la survie de lymphocytes T activés.

12. Molécule agoniste ou antagoniste identifiée par le procédé selon la revendication 11.



1/1

Fig. 1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/BE 99/00149

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07K14/705 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 417 972 A (BHAT, N.M. ET AL.) 23 May 1995 (1995-05-23) * Col. 2, lines 5-24 and 53-60; claims * -----	1,3,11

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### ° Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 2000

Date of mailing of the international search report

25.02.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2230 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hermann, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT /BE 99/00149

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See supplemental sheet INFORMATION FOLLOW-UP PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**☐  
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1, 3, 11 (partly); no search carried out on Claims 2, 6-10, 12

Claims 1, 3, 11: a glycoprotein is not sufficiently identified by its molecular weight, and a vague description of its origin and its function, to enable a complete search. Consequently, likewise an antibody against the glycoprotein, and the use of same are not sufficiently described.

Claims 2, 6-10, 12: No physico-chemical or structural definition is given for the agonists and antagonists or the glycoprotein of Claim 1. A large number of known compounds (at least implicitly) may have the required activity.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search report has been established need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1 (e)). The applicant is warned that the guideline adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examining Authority is not to proceed with a preliminary examination of a subject matter unless a search has been carried out thereon. This position will remain unchanged, notwithstanding that the claims have or have not been modified, either after receiving the search report, or during any procedure under Chapter II.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/BE 99/00149

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5417972 A	23-05-1995	AU 7519794 A	28-02-1995
		EP 0712307 A	22-05-1996
		WO 9503770 A	09-02-1995
		US 5593676 A	14-01-1997
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No

PCT/BE 99/00149

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C07K14/705 C07K16/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 417 972 A (BHAT, N.M. ET AL.) 23 mai 1995 (1995-05-23) * Col. 2, lignes 5-24 et 53-60; revendications * -----	1, 3, 11

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25.02.00

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hermann, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/BE 99/00149

## **Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
  
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## **Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
  
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
  
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No. PCT/BE 99/00149

### SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1,3,11: recherché en partie; pas de recherche pour 2, 6-10,12

Revendications 1,3,11: une glycoprotéine n'est pas suffisamment identifiée par son poids moléculaire, et une vague description de son origine et de sa fonction, afin de permettre une recherche complète. Par conséquent, aussi un anticorps contre la glycoprotéine, et l'utilisation de ladite ne sont pas suffisamment décrits.

Revendications 2,6-10,12: Aucune définition physicochimique ou structurelle n'est donnée pour les agonistes et antagonistes de la glycoprotéine de la revendication 1. Une multitude de composées connus peut (au moins implicitement) avoir l'activité requise.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/BE 99/00149

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5417972 A	23-05-1995	AU 7519794 A	28-02-1995
		EP 0712307 A	22-05-1996
		WO 9503770 A	09-02-1995
		US 5593676 A	14-01-1997